Über die chromatographische Trennung von Colesterin und Cholesterinestern und ihre quantitative Auswertung

Greta Wanyik

1962

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546810_0069

AUS DER
MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Prof. Dr. W. Seitz

Über die chromatographische Trennung von Colesterin und Cholesterinestern und ihre quantitative Auswertung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Greta Wanyik
aus Beszterce

München 1962

A. Schubert, München 5, Corneliusstr. 21 · Telefon 221777

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Professor Dr. N. ZÖLLNER
Mitberichterstatter:	Professor Dr. W. SEITZ
Dekan:	Professor Dr. W. SEITZ

Tag der mündlichen Prüfung: 31.7.1962

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

EINLEITUNG 7

METHODIK 7

QUANTITATIVE AUSWERTUNG 8

ERGEBNISSE 9

QUANTITATIVE AUSWERTUNG MIT DEM ELPHOR-INTEGRAPH 10

ABBILDUNGEN 12

ZUSAMMENFASSUNG 22

ADDENDUM 22

LITERATURVERZEICHNIS 24

EINLEITUNG

Im Laboratorium fehlte bislang ein einfaches, schnell und genau arbeitendes Verfahren, das eine befriedigende Auftrennung der Cholesterinester und ihre quantitative Bestimmung ermöglichte. Die früheren komplizierten und zeitraubenden Methoden durch chemische oder chromatographische Charakterisierung der Fettsäuren nach vorangehender Spaltung der Esterfraktion (1, 2) oder durch eine langdauernde Säulenchromatographie (3), können durch die hier angegebene Methode erheblich vereinfacht und verkürzt werden.

METHODIK

Wir haben in Anlehnung an eine Mitteilung von Weicker (4) eine Methode entwickelt, die mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie nach Stahl (5) Cholesterinestergemische sauber voneinander trennt. Die Herstellung der Kieselgeldünnschichtplatten (Grösse 20 mal 20 cm) mit den eigens hierzu entwickelten Geräten ist einfach (6). Mit einem spitzen Gegenstand aus Plastik werden in 2 cm Abstand parallele Linien gezogen, welche die Kieselgelplatten in neun Bahnen teilen. Auf jeder Bahn werden 3 cm vom Plattenrand die Cholesterin und Cholesterinester enthaltenden Serumextrakte der einzelnen Patienten als möglichst schmaler Strich senkrecht zur Bahn in kleinen Punkten aufgetragen. Dieser Strich darf den grössten Teil der Breite der jeweiligen Bahn einnehmen, aber man muss darauf achten, nicht zu nahe an den Bahnrand heranzukommen, da sonst ein Teil des Extraktes verloren geht, und die unten beschriebene quantitative Bestimmung ungenau wird.

Die aufgetragenen Extrakte sind nach der Methode von Sperry (7) hergestellt, bzw. nach einer einfacheren Methode nach Zöllner (8) gereinigt. Die Hälfte des gereinigten Extraktes wird verdampft, der Rückstand in 0,5 ml Chloroform wieder gelöst, wovon dann 0,005 ml auf die Kieselgelplatte aufgetragen werden. Die aufgetragenen Extraktmengen entsprechen 0,04 ml Serum, bzw. etwa 120 Gamma Cholesterin und dessen Ester. Bei hypercholesterinämischen Seren muss entsprechend weniger verwendet werden, da sonst die Trennung der einzelnen Fraktionen unscharf ist (Abb. 1, Bahn 5).

Die Entwicklung des Chromatogramms erfolgt aufsteigend in einer zwei Stunden vorher mit Tetrachlorkohlenstoff gesättigten Kammer. Die Kammer soll möglichst luftdicht abgeschlossen sein und innen mit Filtrierpapier austapeziert, was zu einer besseren Sättigung beiträgt. Die Platten werden 1 bis 1,5 cm tief in Tetrachlorkohlenstoff gestellt. Parallel zum oberen Rand der Platte wird in etwa

3,5 cm Abstand eine Linie durch die Kieselgelschicht gezogen, die anzeigt, wie hoch die Platte jedesmal entwickelt werden soll. Nach jeder Entwicklung wird die Platte kurz an der Luft getrocknet und dann erneut entwickelt. Dies wird zweimal wiederholt. Eine viermalige Entwicklung führt zu einer noch besseren Trennung (Abb. 2), jedoch ist eine dreimalige Entwicklung für die meisten Zwecke ausreichend. Der gesamte Vorgang nimmt dreieinhalb bis vier Stunden Zeit in Anspruch.

Zum Nachweis des Cholesterins und seiner Ester besprüht man die Platten mit gesättigter Antimontrichloridkösung und erhitzt sie für 20 Minuten auf 110°C. Bereits ein Gamma Cholesterin oder dessen Ester ergibt eine gute und deutliche Farbreaktion. Die gesättigte Lösung von Antimontrichlorid in Chloroform muss jeweils frisch hergestellt werden. Die Farbreaktionen der verschiedenen Ester des Cholesterins geben verschieden intensive Farben, die vom tiefen Purpurviolett bis ins Bläuliche, ja sogar Bräunliche reichen.

Diese bis jetzt beschriebene Methode ergibt fünf deutlich sichtbare Fraktionen. Es ist auch möglich sieben Fraktionen zu bekommen (Abb. 3), allerdings mit etwas verschiedener experimenteller Technik und Apparatur. Die hierfür verwendeten Kieselgelplatten haben eine Grösse von 20 mal 40 cm und werden genau so hergestellt wie oben angegeben. Der wesentliche Unterschied besteht darin, dass man nur einmal, und zwar 18 bis 24 Stunden, in einer nicht dicht geschlossenen und daher nicht ganz gesättigten Kammer entwickelt.

Die bis jetzt beschriebene Entwicklungsmethode der Chromatographie war aufsteigend. Wir haben auch eine gute Trennung mit absteigender Entwicklung bekommen, allerdings waren die einzelnen Fraktionen nicht so scharf voneinander getrennt. Die Apparatur dazu haben wir selbst konstruiert (Abb. 4).

QUANTITATIVE AUSWERTUNG

Die mit Antimontrichlorid besprühten und dadurch sichtbar gemachten Cholesterine und Cholesterinester kann man zur quantitativen Auswertung nicht mehr verwenden. Deshalb werden auf einer Platte immer jeweils zwei Bahnen mit dem gleichen Extrakt beschickt und zwar spiegelbildlich von der Plattenmitte aus nach beiden Seiten. So befinden sich also auf der rechten und linken Seite der Platte je zwei sich entsprechende Bahnen. Nachdem die Platte entwickelt ist, färbt man nur ihre eine Hälfte und kann nun die spiegelbildlich entsprechenden nicht gefärbten Stellen zur quantitativen Auswertung benützen. Diese Stellen, welche die einzelnen Fraktionen enthalten, werden mit einem Spatel in ein Zentrifugenglas abgekratzt, nachdem man vorher ihre genaue Länge notiert hat. Dabei soll möglichst kein Kieselgel verlorengehen.

Zur quantitativen Bestimmung haben wir verschiede bekannte Farbreaktionen (9, 10, 11) verwendet; mit dem Reagens nach Zak (11) werden die besten Ergebnisse erzielt. Auch mit der Liebermann-Burchard Reaktion sind die Resultate befriedigend, aber erst von 50 Gamma an aufwärts. Da man aber nicht mehr als 120 Gamma Extrakt auftragen kann, um eine befriedigende Trennung zu bekommen, und weil gewisse Esterfraktionen nur fünf oder teilweise sogar nur 2 Gamma ausmachen, kommt diese Reaktion nicht in Frage.

Die Abbildung 5 zeigt, wie sich die Reagenzien nach Zak und Liebermann-Burchard verhalten.

In die Reagensgläser, welche die verschiedenen Cholesterinesterfraktionen enthalten, werden 3 ml Eisessig und 2 ml Eisenchlorid-Schwefelsäure-Reagens gegeben. Dann wird sofort mit einem am Ende breitgeformten Glasstab kräftig durchgerührt. Dann lässt man die Proben eine Stunde im Dunkeln stehen. Vor Ablauf einer Stunde werden die Proben 10 Minuten scharf zentrifugiert und gleich darauf wird die Extinktion gegen Filter 546 im Photometer "Eppendorf" abgelesen.

Um eine Fehlerquelle zu vermeiden wird eine Kieselgelplatte in der Tetrachlorkohlenstoffkammer leer entwickelt; dann werden verschiedene Längen von Bahnteilen als Leerwert bestimmt. Die Abbildung 6 zeigt einen solchen Leerversuch, den man bei jeder neuen Kieselgelpackung wiederholen muss. Weiterhin ist hier zu beachten, dass bei allen Versuchen immer dieselbe Zentrifuge, Geschwindigkeit und Zeit benützt werden muss. Die gestrichelte Linie in Abbildung 6 zeigt den Unterschied bei verschieden langem Zentrifugieren.

Die Ausrechnung erfolgt in mg% und in Prozenten der gesamten Cholesterinester nach Korrektion der Extinktion der Leerversuche, wobei die Länge der jeweils abgekratzten Fraktionen beim Leerwert zu berücksichtigen ist.

ERGEBNISSE

Wie der Abbildung 7 zu entnehmen ist, ergibt die Summe der einzeln bestimmten Cholesterinesterfraktionen nahezu den gleichen Wert wie die direkte Analyse, bzw. die Analyse des Digitoninniederschlages des Serumextraktes. Das freie Cholesterin ist bei der Analyse durch Kieselgel etwa 10 % mehr. Die Ursache liegt an der Bräunung von Phosphatiden und Triglyceriden, die bei Tetrachlorkohlenstoffentwicklung auf derselben Stelle verharren wie das freie Cholesterin. Alle hier angeführten Ergebnisse lassen sich leicht reproduzieren.

Die Untersuchungen in Abbildung 8 zeigen die Verteilung des Cholesterins auf die verschiedenen Esterfraktionen. Die Tabelle enthält auch gleichzeitig die Ergebnisse von Klein und Janssen (3) und Ahrens und Mitarbeitern (2). Die Abbil-

dung 9 zeigt die Ergebnisse, wenn man synthetische Cholesterinester mitchromatographiert, was zur Identifizierung der verschiedenen Fraktionen benützt werden kann.

Interessant sind einige zufällige Beobachtungen, die sich bei der Ausarbeitung der Methode ergaben. Wenn man die gereinigten Serumextrakte durch Verdampfung einengt und trocken aufbewahrt, verändert sich das Verhältnis der Ester zum freien Cholesterin, und zwar lassen sich die Fraktionen f und e mit Antimontrichlorid nicht mehr nachweisen. Das freie Cholesterin nimmt an Quantität zu; dies ist von Zeit und Temperatur abhängig. Trockene Extrakte, die im Eisschrank aufbewahrt worden sind, zeigen wesentlich weniger Veränderungen als solche, die bei Zimmertemperatur aufbewahrt worden sind. Um möglichst genaue Werte zu bekommen empfiehlt es sich deshalb, die Extrakte gleich nach dem Eindampfen zu verarbeiten oder sie in Chloroformlösung im Eisschrank aufzubewahren, jedoch nicht länger als 14 Tage.

QUANTITATIVE AUSWERTUNG MIT DEM ELPHOR-INTEGRAPH (12)

Für die quantitative Auswertung haben wir noch eine Methode entwickelt. Wir liessen spezielle Glasstreifen anfertigen, die in die Rahmen des Elphorgerätes hineinpassen. Diese Glasstreifen wurden genau so behandelt wie die Chromatogramme, nur anstatt sie chemisch auf die Quantität des jeweiligen Cholesterinesters zu untersuchen, liessen wir sie durch das Elphorgerät laufen. Abbildung 10 zeigt eine typische Extinktionskurve von normalem Serum. Die Ausmessung erfolgte mit einem Elphor-Spezialplanimeter. Die Berechnung erfolgt in Prozent, bezogen auf die nach Zak bestimmten Cholesterinester. Diese Ergebnisse lassen sich auch leicht reproduzieren, sind aber gegenüber der oben angegebenen Methode mit einer grösseren Fehlermöglichkeit behaftet. Für eine schnelle Bewertung lässt es sich aber gut verwenden.

Bei unseren Untersuchungen mit dem Elphor-gerät kam es uns auf die Beantwortung folgender Fragen an:

Wieviel Gamma Cholesterin und Cholesterinester kann man maximal bestimmen? Wie verhalten sich die Ester der gesättigten und ungesättigten Fettsäuren? Werden sie mit der gleichen Intensität durch Antimontrichlorid angefärbt?

Es ergab sich, dass äquimolekulare Mengen von Cholesterin und Cholesterinestern dieselbe Extinktionskurve an derselben Kieselgelplatte lieferten (Abb. 11). Mit genügender Genauigkeit können am Elphor-Integraph maximal 30 Gamma Cholesterin, bzw. 15 bis 20 Gamma Cholesterinester bestimmt werden. Höhere Konzentrationen geben eine Extinktionskurve, die nicht proportional zu aufgetra-

gener Menge verläuft (s. Abb. 12 und 13). Kleinere Mengen bis zu 1 Gamma Cholesterin, bzw. äquimolekulare Mengen Cholesterinester lassen sich mit ziemlicher Genauigkeit bestimmen. Die gesättigten Fettsäuren geben keine Farbreaktion mit Antimontrichlorid und benötigen deshalb keine Korrektion bei der quantitativen Bestimmung. Von den ungesättigten Fettsäuren haben wir Ölsäure und Linolsäure untersucht. Linolsäure färbt sich mit Antimontrichlorid, und die Planimeterwerte unter dem Gipfel des Linolsäureesters müssen deshalb mit einem, experimentell bestimmten, Faktor von 0,82 multipliziert werden, ehe die Berechnung der Relativprozente erfolgt. Ölsäure dagegen färbt sich mit Antimontrichlorid nicht an.

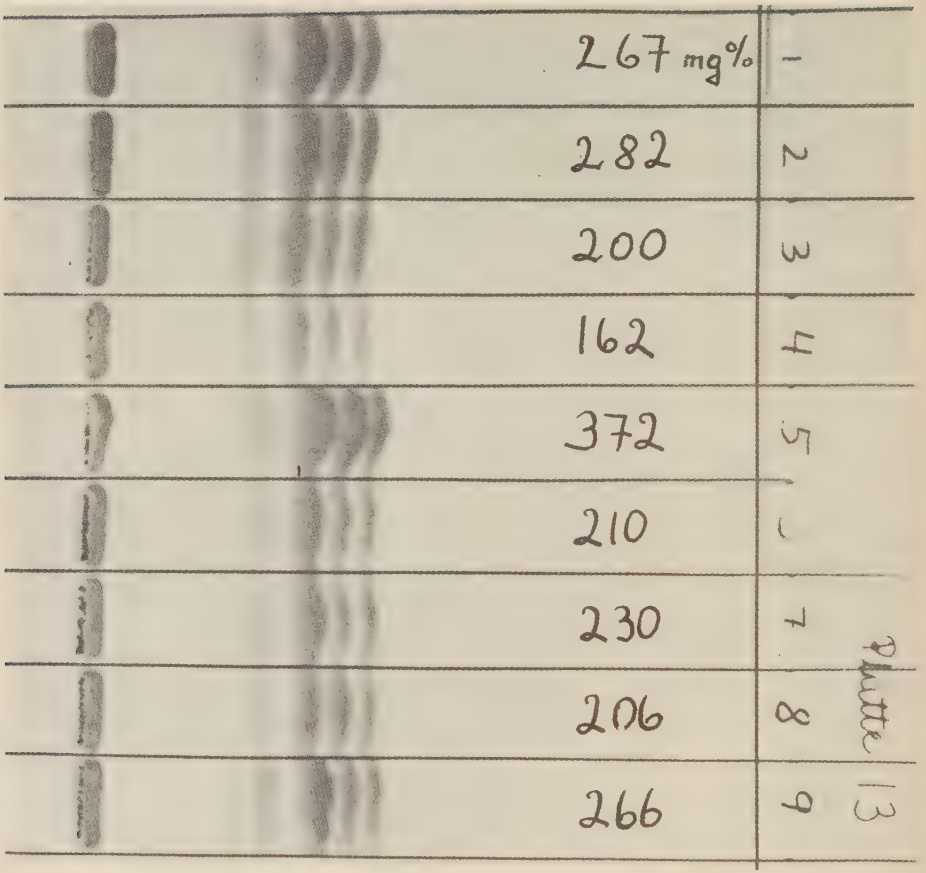

ABBILDUNG 1: Neun verschiedene Seren von gesunden Personen. Jede der Bahzeigt wieviel Gesamtcholesterin in den jeweiligen Seren vorhanden war. Eine dreimalige Entwicklung in Tetrachlorkohlenstoff zeigt deutlich fünf voneinander gut getrennte Fraktionen (Fraktion 5 ist bei der Photokopie nur schlecht zu reproduzieren).

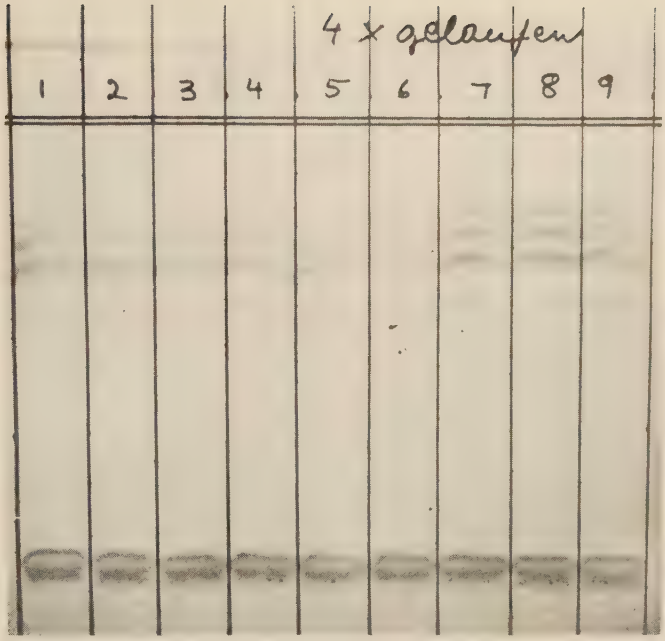

ABBILDUNG 2: Eine viermalige Entwicklung in Tetrachlorkohlenstoff zeigt eine noch deutlichere Trennung der fünf Fraktionen.

ABBILDUNG 3: Sieben Cholesterinesterfraktionen, gut voneinander getrennt.

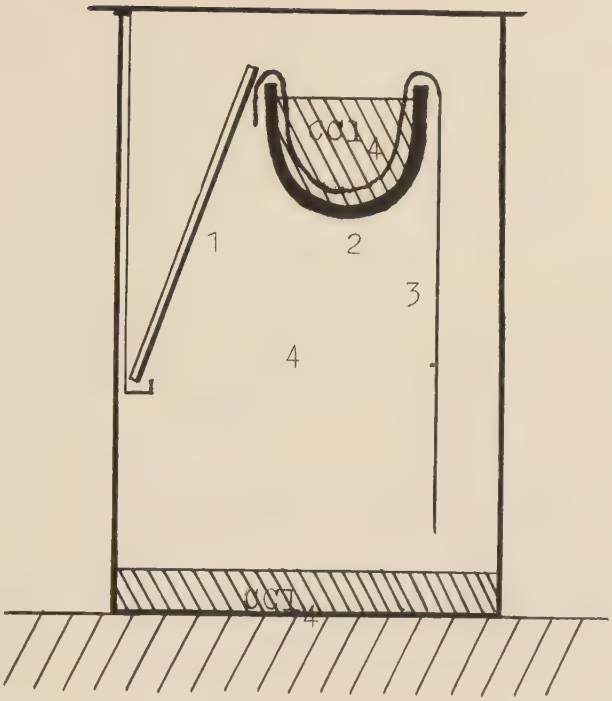

ABBILDUNG 4: Apparatur für absteigende Dünnschichtchromatographie:
1 = Glasplatte mit Kieselgelschicht
2 = Tetrachlorkohlenstoffbehälter
3 = Filterpapier
4 = Luftdicht geschlossene, mit Tetrachlorkohlenstoff gesättigte Kammer

Gamma Cholesterin	EXTINKTIONSWERTE IM PHOTOMETER "EPPENDORF"			
	Filter 546		Filter 578	
	Cholesterin auf Kieselgel aufgetragen, in CCl_4 entwickelt und nach Zak bestimmt	Cholesterin direkt nach Zak bestimmt	Cholesterin auf Kieselgel aufgetragen, in CCl_4 entwickelt und nach Liebermann-Burchard bestimmt	Cholesterin direkt nach Liebermann-Burchard bestimmt
1	0,000	0,001		
2	0,002	0,007		
4	0,007	0,015		
10	0,021	0,046		
20	0,060	0,105		0,006
50	0,197	0,268	0,002	0,014
100	0,449	0,500	0,016	0,026
150	0,708	0,790	0,031	0,031
200	0,961	0,992	0,043	0,041

ABBILDUNG 5: Die Tabelle zeigt die verschiedenen Extinktionswerte von Cholesterin nach den Methoden von Zak und Liebermann-Burchard.

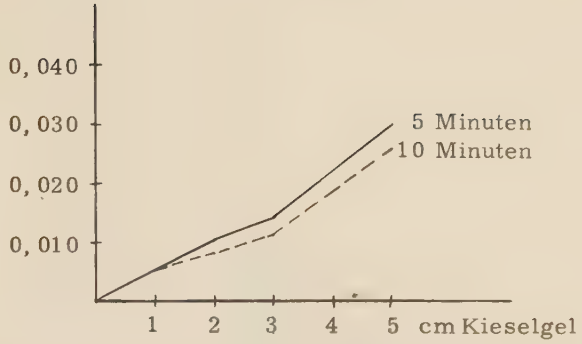

ABBILDUNG 6: Die Kurve zeigt den Anstieg der Extinktionswerte (bei Einsatz in die Cholesterinbestimmung nach Zak) wenn verschiedene Längen von Bahnteilen als Leerwert bestimmt werden. Die Breite der Bahnen beträgt jeweils 2 cm; Extinktion mit Filter 546 im Eppendorf gemessen. Gleichzeitig wird der Einfluss des Kieselgels bestimmt. Die Zeitangaben beziehen sich auf die Dauer der Zentrifugierung.

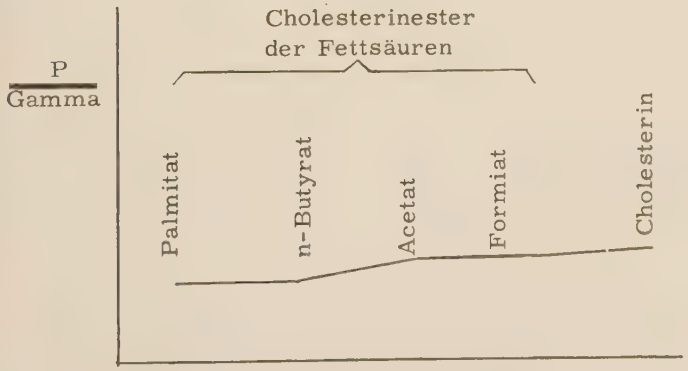

ABBILDUNG 7: Durchschnittliche Ergebnisse von 15 normalen Seren.

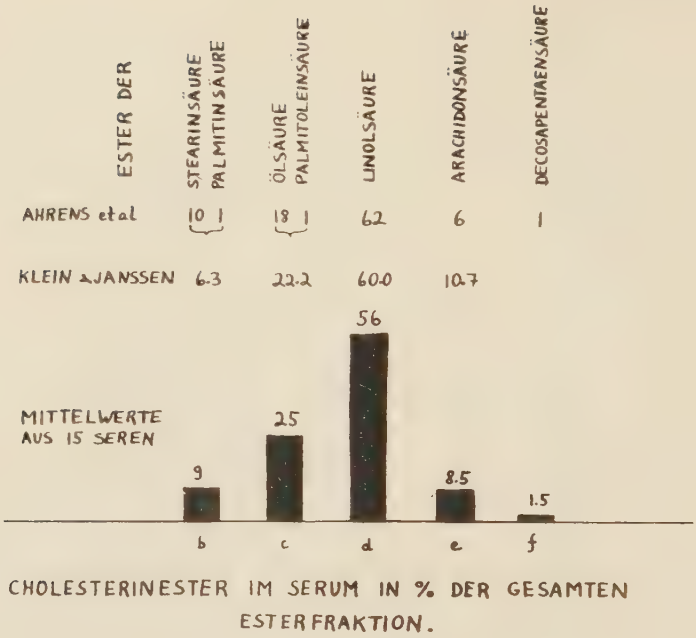

ABBILDUNG 8: Die Verteilung von Cholesterin auf verschiedene Esterfraktionen. Mittelwerte von 15 normalen Seren.

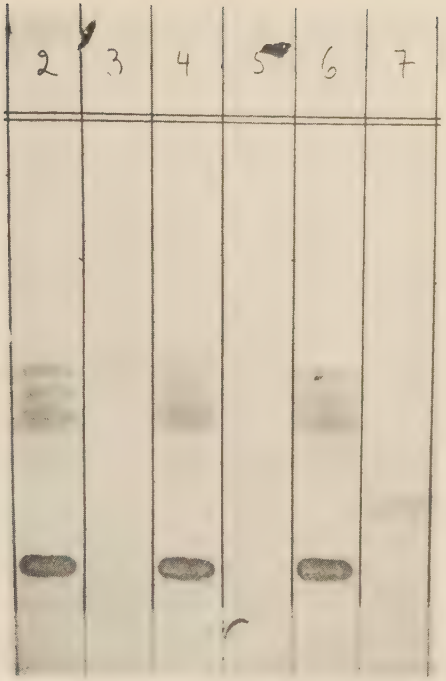

ABBILDUNG 9: Bahnen 2, 4 und 6: Lipoidextrakt aus dem gleichen Serum
Bahn 3: Cholesterinpalmitat
Bahn 5: Cholesterinbutyrat
Bahn 7: Cholesterinacetat
(Fraktion 5, deren fotographische Darstellung nicht gelang, ist bei der Betrachtung des Originalchromatogrammes deutlich zu erkennen.)

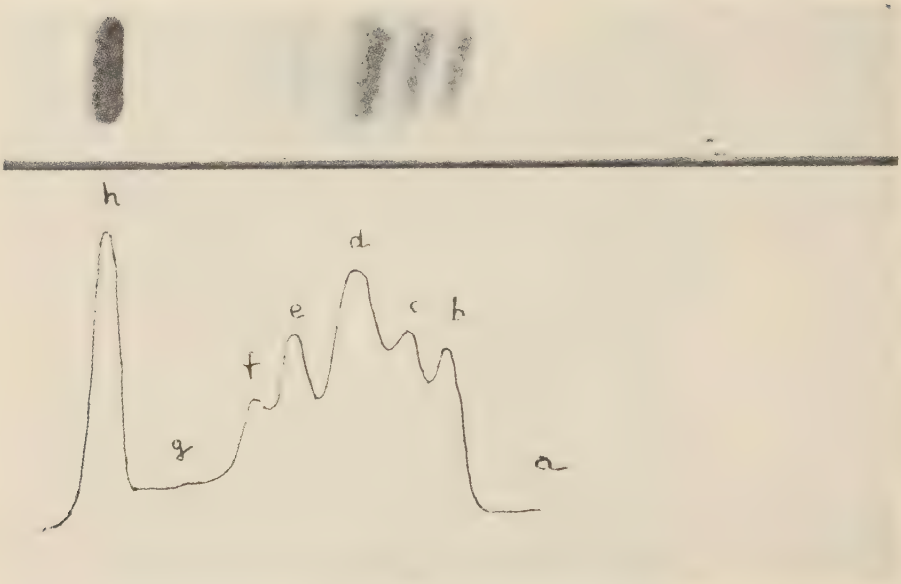

ABBILDUNG 10: Typische Extinktionskurven der mit Antimontrichlorid gefärbten Cholesterinester im Elphorintegraphgerät.

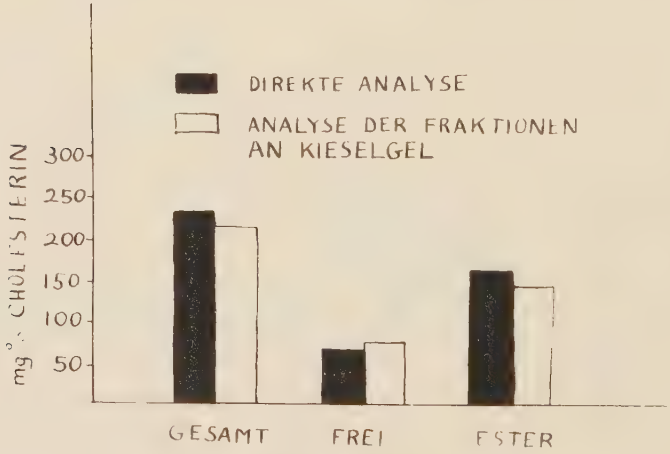

ABBILDUNG 11: 5 Gamma Cholesterin, bzw. 5 Gamma Cholesterin enthaltende Ester gesättigter Fettsäuren ergeben nur gering voneinander abweichende P/Gamma Werte (P = Planimetrisch bestimmte Flächen der jeweiligen Extinktionskurven, Gamma = Cholesteringehalt)

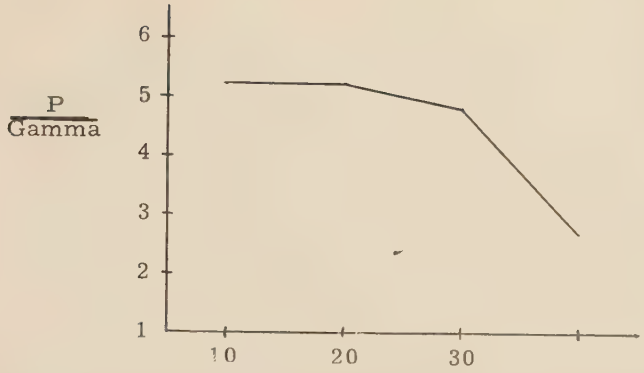

ABBILDUNG 12: Bis 20 Gamma Cholesterin ist die erzielte Farbreaktion, bzw. deren planimetrische Auswertung der eingesetzten Cholesterinmenge proportional

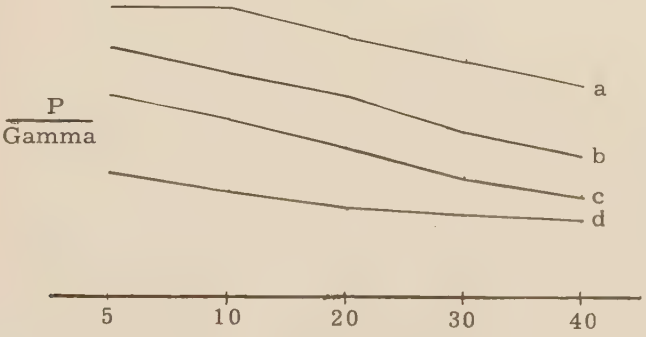

ABBILDUNG 13: Bei Einsatz von Cholesterinestern reicht die Proportionalität von eingesetzter Menge zu Farbbildung nur bis 10 Gamma (angegeben als Cholesterin); vergl. Abb. 12.
Es bedeuten: Kurve a Cholesterinpalmitat
Kurve b Cholesterinformiat
Kurve c Cholesterinacetat
Kurve d Cholesterin-n-butyrat

ZUSAMMENFASSUNG

In den vorliegenden Untersuchungen wurde ein einfaches chromatographisches Verfahren zur Trennung und quantitativen Bestimmung von Cholesterin und seinen Estern angegeben.

Der geringe Arbeitsaufwand und die gute Reproduzierbarkeit dieser Methode lässt erwarten, dass sie eine wertvolle und brauchbare Erweiterung der bisher bekannten Verfahren der Lipoidanalysen in Forschung und Klinik ergeben wird.

In den 13 Abbildungen sind unsere Ergebnisse zusammengestellt.

ADDENDUM

Die experimentellen Arbeiten wurden im Juli 1960 abgeschlossen. Die beschriebene Methode und ihre Weiterentwicklung sind inzwischen publiziert (8, 13); einige wichtige neue Beobachtungen, die die Methode ermöglicht hat, sind ebenfalls veröffentlicht worden (14, 15).

Am Schluss meiner Arbeit darf ich mir erlauben, Herrn Prof. Dr. med. Nepomuk Zöllner für die Überlassung des Themas und für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit meinen Dank auszusprechen.

Ebenso danke ich Frl. Katharina Kirsch für wertvolle Ratschläge.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Lewis, B. : Lancet II (1958) 71

2. Ahrens, E. H. jr., Insull, W. jr., Hirsch, J., Stoffel, W., Peterson, M. L., Farquhar, J. W., Miller, T., Thomasson, H. J. : Lancet I (1959) 115

3. Klein, P. D. und Janssen, E. T. : J. Biol. Chem. 234 (1959) 1417

4. Weicker, H. : Klin. Wschr. 37 (1959) 763

5. Stahl, E. : Chem. Ztg. 82 (1958) 323

6. C. Desaga GmbH., Heidelberg Schliessfach 422: Arbeitsvorschrift für die Dünnschichtchromatographie nach Doz. Dr. E. Stahl

7. Sperry, W. M. : Lipide Analysis in: Methods of Biochemical Analysis, Bd. II, S. 83 Interscience Publishers, Inc. New York 1955

8. Zöllner, N., Kirsch, K. und Amin, G. : Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 66 (1960) 677

9. Schön, H. : Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem. 303 (1956) 81

10. Schoenheimer, R. und Sperry, W. M. : J. Biol. Chem. 106 (1934) 745

11. Zak, B., Dickenmann, R C., White, E. G., Burnett, H. und Cherney, P. J. : Amer. J. Clin. Pathol. 24 (1954) 1307

12. Elphor-Integraph Auswertgerät, Dr. Bender u. Dr. Hobein München

13. Zöllner, N., Wolfram, G. und Amin, G. : Klin. Wschr. 40 (1962) 273

14. Zöllner, N., und Wolfram, G. : Klin. Wschr. 39 (1961) 817

15. Zöllner, N. und Wolfram, G. : Klin. Wschr. 40 (1962) 273

LEBENSLAUF

Am 22. Januar 1931 wurde ich als Tochter des Kaufmanns Paul Wanyik in Beszterce (Siebenbürgen) geboren. Die Volksschule besuchte ich in Siebenbürgen, die Oberschule in Siebenbürgen und Kalifornien. 1955 habe ich an der Universität von Kalifornien in Los Angeles das Diplom "Bachelors of Arts" in Zoologie erhalten. Anschliessend arbeitete ich zwei Jahre als Assistentin für eine medizinische Forschungsgesellschaft.

1957 immatrikulierte ich mich an der Universität München, bestand am Ende des Wintersemesters 1958/59 die ärztliche Vorprüfung und schloss im Juni 1962 mein Studium mit dem Staatsexamen ab.